

特開平5-238948

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

| (5)Int.Cl. ³ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|-------------------------|-------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 37/02 | A D Z | 8314-4C | | |
| C 0 7 K 7/10 | | 8318-4H | | |
| C 1 2 P 21/06 | | 8214-4B | | |

審査請求 未請求 請求項の数7(全 9 頁)

| | | | |
|----------|-----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平3-150604 | (71)出願人 | 000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)6月21日 | (72)発明者 | 富田 守 神奈川県横浜市金沢区東朝比奈1-47-6 |
| | | (72)発明者 | 島村 誠一 神奈川県横浜市港北区篠原町1558 |
| | | (72)発明者 | 川瀬 興三 埼玉県浦和市白鯉761-1 |
| | | (72)発明者 | 福波 康夫 神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘3-1-4-103 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 西澤 利夫 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 高純度ラクトフェリシンの大量製造法

(57)【要約】

【目的】 広範囲の微生物に対して抗生物質とほぼ同等の抗菌作用を有するラクトフェリシンを少なくとも90%の純度で、かつ少なくともグラム単位で製造する方法を提供する。

【構成】 牛ラクトフェリンの酵素分解物であって、抗菌性ペプチド(ラクトフェリシン)を含有するペプチド混合物をブチル基を有するクロマトグラフ用担体または陽イオン交換クロマトグラフ用担体に吸着させ、この担体を洗浄し、抗菌性ペプチドを溶出し、溶出液を濃縮することを特徴とする高純度ラクトフェリシンの大量製造法。

【効果】 人および動物に有害な化学薬品(例えば有機溶媒等)を使用しないので、安全に大量の高純度ラクトフェリシンを製造することができ、複雑な装置等を使用せずに簡単に高純度のラクトフェリシンを製造することができ、更に所望の製造量に合わせて容易に規模を増減できる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、そのような分析的規模の精製方法は、ラクトフェリシンの純度測定には適しているものの、商業的規模で大量に高純度ラクトフェリシンを製造する方法としては望ましくない。この発明は、以上のこととりの事情に鑑みてなされたものであり、少なくとも90%の純度を有する高純度ラクトフェリシンを、少なくともグラム単位の量で大規模に、しかも安全かつ簡便に製造するための新しい製造方法を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、牛ラクトフェリシンの酵素分解物であって、抗菌性ペプチドを含有するペプチド混合物を疎水性基を有するクロマトグラフ用担体または陽イオン交換クロマトグラフ用担体に吸着させ、この担体を洗浄し、抗菌性ペプチドを溶出し、溶出液を脱塩することを特徴とする高純度ラクトフェリシンの大量製造法を提供する。

【0009】この発明の方法に使用する出発物質（ラクトフェリシンを含有するペプチド混合物、以下同じ）

は、ラクトフェリシンを含有するも如何なるペプチド混合物であってもよく、例えば粗製牛ラクトフェリンまたは牛ラクトフェリンを含有する牛乳蛋白質の混合物の酵素加水分解物等であり、望ましくは純粋の牛ラクトフェリンを酵素加水分解したペプチド混合物である。

【0010】ラクトフェリンの加水分解に使用する酵素

は、牛ラクトフェリンを分解してラクトフェリシンを生成するプロテアーゼであれば、どのようなプロテアーゼであってもよいが、ペプシンが望ましい。出発物質を、水または塩溶液（望ましくは水）に溶解し、pHを5.5から7.5、望ましくは6.0〜7.0に調整し、不溶物がある場合は遠心または濾過により除去する。出発物質調整の望ましい態様をせば、次のとおりである。

【0011】脱脂乳またはホエーから単離した牛ラクトフェリンを蒸留水に5%（W/V）の濃度で溶解し、1規定塩酸水溶液でpHを3.0に調整する。ペプシンを基質に対して約3%の割合で添加し、37℃で4時間保持して加水分解し、のち80℃で15分間加熱して反応を停止させる（必ずしも反応を停止させなくてもよい）。次いで

1規定水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.0に調整し、不溶物がある場合は遠心するか、または濾過するかの方法によりそれらを除去する。得られたペプチド混合物を含有する溶液をそのままラクトフェリシンの製造に利用することもでき、常法により凍結乾燥または噴霧乾燥して粉末として保存することもできる。ラクトフェリシンを含有する粉末のペプチド混合物は水または塩溶液に溶解してラクトフェリシンの製造に利用することができる。

【0012】ラクトフェリシンは次の2つの方法により

製造することができるが、第1の方法がより望ましい。すなわち、この第1の方法は、ラクトフェリシンを含有するペプチド混合物の溶液を疎水性基を有するクロマトグラフ用担体（以下疎水性担体と記載する）に吸着させ、疎水性担体を洗浄して非吸着ペプチドを除去し、ラクトフェリシンを一定のpH（例えばブチル基を有する疎水性担体の場合、望ましくはpH4.8〜5.2）で溶出し、得られた溶出液を脱塩する。使用する疎水性担体としては、ブチル基を有する例えばブチル・トヨパール（商標、東ソー社製）、ブチル・セファロース（商標、ファルマシア社製）等が望ましく、特にブチル・トヨパールが望ましい。その他例えば、ヘキシル基、オクチル基、フェニル基またはオクチルアミン基を有する疎水性担体も同様にこの発明の方法に使用できることはいうまでもないことである。

【0013】疎水性担体を水洗し、水で平衡化したが、この工程は攪拌子付きタンク内、クロマトグラフ用カラム内、またはこれらを組合わせて行う。望ましい態様は、疎水性担体と出発原料との吸着を攪拌子付きタンク内で行って液を集め、疎水性担体をクロマトグラフ用カラムに充填し、集めた液を再度カラム中の疎水性担体に吸着させる。出発物質を疎水性担体に吸着させ、のち疎水性担体を水で洗浄し、疎水性担体に吸着していないペプチドを除去する。この工程で得られた疎水性担体に吸着していないペプチドは、栄養価の高い副産物として利用することができる。疎水性担体の洗浄を、蛋白質の存在を示す洗浄水の280nmにおける吸光度が0.06以下になるまで継続する。

【0014】水で疎水性担体を洗浄後、緩衝液を通過する。疎水性担体の洗浄を緩衝液で行うこともできる。次いで稀酸水溶液を通過して疎水性担体から吸着しているラクトフェリシンを溶出す。ラクトフェリシンは、一定のpH例えばブチル基を有する疎水性担体の場合4.5から5.5、望ましくは4.8から5.2に調整された緩衝液によっても選択的に溶出することができる。疎水性担体に吸着されている成分は、より高い酸濃度の緩衝液により溶出され、この中に若干のラクトフェリシンが含有されているので高い純度を要しないラクトフェリン含有製品に利用することができる。全ての吸着物を除去した疎水性担体を水で充分洗浄し、再利用することができる。

【0015】使用する酸は、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、クエン酸等であり、塩酸が特に望ましい。酸の最終濃度は1〜30ミリモル、望ましくは10ミリモルである。使用する緩衝液は、第一リン酸ナトリウム-第二リン酸ナトリウム、第一リン酸カリウム-第二リン酸カリウム、第一リン酸ナトリウム-第二リン酸カリウム、第一リン酸カリウム-第二リン酸ナトリウム、クエン酸-第二リン酸ナトリウム、酢酸-酢酸ナトリウム等であり、クエン酸-第二リン酸ナトリウムが望ましい。緩衝液の濃度は、20〜200ミリモルであり、100〜2

5

0.0ミリモルが望ましい。また緩衝液のpHは、例えばブチル基を有する陰水性担体の場合6.5 から7.5 であり、7.0 が望ましい。

【0016】次いで溶出液は後述する方法により脱塩される。ラクトフェリンを製造する第2の方法は、次のとおりである。ラクトフェリンを含有するペプチド混合物の溶液を陽イオン交換クロマトグラフ用担体（以下陽イオン担体と記載し、この陽イオン担体と上記疎水性担体とをまとめて担体と記載することがある）に吸着させ、陽イオン担体を洗浄して非吸着ペプチドを除去し、ラクトフェリンを塩溶液で溶出し、溶出液を脱塩する。使用する陽イオン担体としては、カルボキシメチル基を有する例えばカルボキシメチル・トヨパール（商標、東ソー社製）、カルボキシメチル・セファロース（商標、ファルマシア社製）、カルボキシメチル・バイオ・ゲルAアガロース（商標、バイオラッド・ラボラトリー社製）、カルボキシメチル・セルロース（バイオラッド・ラボラトリー社製）等が望ましく、特にカルボキシメチル・トヨパール（商標、東ソー社製）が望ましい。陽イオン担体を緩衝液で洗浄し、緩衝液で平衡化する。

【0017】出発物質を陽イオン担体に吸着させた後、陽イオン担体を緩衝液で充分洗浄し、陽イオン担体に吸着していないペプチドを除去する。陽イオン担体に吸着していないペプチドは、栄養価の高い副産物として利用することができる。陽イオン担体の洗浄は、蛋白質の存在を示す洗浄緩衝液の280nmにおける吸光値が0.06以下になるまで継続する。

【0018】次いで塩を含む緩衝液を連続して吸着しているラクトフェリンを陽イオン担体から溶出する。ラクトフェリンは、例えばカルボキシメチル基を有する陽イオン担体の場合1モルから4モルの最終塩濃度、望ましいは2モル〜4モルに調整した緩衝液により選択的に溶出することができる。使用する塩は、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム等であり、酢酸アンモニウム、または塩化アンモニウムが望ましい。酢酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムは水に溶解して、塩化カリウムおよび塩化ナトリウムは後述する緩衝液に溶解して、それぞれ使用する。

【0019】使用する緩衝液は、第一リン酸ナトリウム〜第二リン酸ナトリウム、第一リン酸カリウム〜第二リン酸カリウム、第一リン酸ナトリウム〜第二リン酸カリウム、第一リン酸カリウム〜第二リン酸ナトリウム、クエン酸〜第二リン酸ナトリウム、酢酸〜酢酸ナトリウム、グリシン〜水酸化ナトリウム等であり、第一リン酸ナトリウム〜第二リン酸ナトリウム、第一リン酸カリウム〜第二リン酸カリウムが望ましい。緩衝液の最終濃度は、例えばカルボキシメチル基を有する陽イオン担体の場合10〜200ミリモルである。その他の態様は上記第1の方法と実質的に同一である。

6

【0020】次いで溶出液を後述する方法により脱塩する。溶出液の脱塩は、次の2つの方法により行うことができるが、第1の方法が望ましい。すなわち、この第1の方法は、ラクトフェリンを含有する溶出液のpHを7〜8に調整し、上記疎水性担体に吸着させ、水で洗浄して塩を除去する。次いで稀酸水溶液でラクトフェリンを溶出し、最終製品を得る。疎水性担体を、水で充分洗浄し、再利用することができる。

【0021】第2の方法は、ラクトフェリンを含有する溶出液を公知の方法（例えば電気透析法、限外濾過法等）で脱塩する方法である。これらの方法を実施する場合、例えば分子量分画3000以下の半透膜またはホロファイバー・フィルター・カートリッジを使用するのが望ましい。これらは、塩を透過して除去し、ラクトフェリン透過しない性質を有している。

【0022】脱塩されたラクトフェリン溶液は、必要に応じて常法（例えば、真空乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥等）により粉末にすることもできる。この発明の方法において、得られるラクトフェリンの量は出発物質に含まれているラクトフェリンの量および使用する担体の量にのみ依存している。この発明の方法においては、100mlの担体を用いて約0.3〜0.5gのラクトフェリンが得られ、収量および純度が低下することなく、かつ担体を再利用できるので、所望の規模（例えば数100gまたは数100kg）に極めて容易にスケールアップすることができる。

【0023】以上のようにして得られたラクトフェリンは、少なくとも90%の純度を有し、先頭に開示された分析規模の方法により製造されたラクトフェリンと同様広範囲の微生物に対して抗菌作用を有している。次に試験例を示してこの発明の方法をさらに詳しく説明する。

（試験例1）この試験は、この発明の方法により製造したラクトフェリンの純度を調べるために行った。

【0024】実施例1と同一の方法により調製した試料を逆相高速液体クロマトグラフ法により分画した。TS-K-GELE 120T (6.0×150mm, 東ソー社製) カラムに試料溶液を通流し、溶出液A (0.05%トリフルオロ酢酸) : 溶出液B (90%アセトニトリル)の0.05%トリフルオロ酢酸 80 : 20の混合液を10分滴の8ml/分の流速で通過し、30分を要して両溶出液の比率を40 : 60までリニアグラジエントで変更して同じ流速で通過した。溶出液の280nmにおける吸光度を連続的に測定してプリンターで記録し、溶出したペプチドの相対的濃度を記録されたペプチドのピークから算出して試験した。

【0025】この試験の結果は、図1に示したとおりである。図1の縦軸は吸光度を、横軸は時間（分）を、それぞれ示している。図1から明らかのようにラクトフェリンは約22分前後に、鋭鋭なピークとして溶出さ

50

れ、ラクトフェリンのピークの前後におずかに不純物がみとめられ、この試料のラクトフェリン濃度は、90%であった。この結果からこの発明の方法により高純度ラクトフェリンを製造し得ることが確認された。

(試験例2) この試験は、この発明の方法において使用する洗浄用緩衝液、洗浄用緩衝液のpH、溶出用緩衝液および溶出用緩衝液のpHの条件を決定するために行った。

【0026】参考例と同一の方法により製造した出発物質2.0 gを5% (W/V) の濃度で水に溶解した。これとは別にブチル・トヨパール (商標、東ソー社製) 650 Mを水で洗浄し、平衡化した。疎水性担体5.0mlに出発物質100mgの割合で、上記溶液を疎水性担体に吸着させ、表1に示す洗浄用緩衝液および溶出用緩衝液の組合わせて疎水性担体を洗浄し、のちラクトフェリンを溶出し、ラクトフェリンの収量および純度を次の方法により測定して試験した。

1) ラクトフェリンの収量

ラクトフェリンの収量は、次式により算出した。

$$【0027】Y = A / 2.203 \times V$$

*

*ここでYは、ラクトフェリンの収量、Aは溶出されたラクトフェリン溶液の280nmにおける吸光度、Vは溶出されたラクトフェリン溶液の総容量、2.203は純ラクトフェリン標準溶液 (1.00mg/ml) の吸光度、をそれぞれ示す。

2) ラクトフェリンの純度

試験例1と同一の逆相高速液体クロマトグラフ法により測定した。

【0028】表1から明らかなようにラクトフェリンの最高の収量および純度は溶出用緩衝液のpHを4.8から5.2、望ましくは5.0に調整したときに得られた。またpH7.0のマッキルベイン緩衝液、第一リン酸ナトリウム-第二リン酸ナトリウム、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液もこの発明に使用できる。

【0029】なお、表1に示した緩衝液以外の緩衝液についてもほぼ同様な結果が得られた。

【0030】

【表1】

| 洗 浄 用 緩 衝 液 | 溶 出 用 緩 衝 液 | ラクトフェリン | |
|---|---|---------|--------|
| | | 収量 (μg) | 純度 (%) |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH7.0 | 0 | — |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH6.6 | 0 | — |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH6.2 | 0.3 | ND |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH5.8 | 0.4 | ND |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH5.6 | 0.5 | 99 |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH5.4 | 1.1 | 98 |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH5.2 | 1.6 | 98 |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH5.0 | 2.0 | 98 |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH4.8 | 2.0 | 97 |
| マッキルベイン、pH7.0 | マッキルベイン、pH4.6 | 2.2 | 93 |
| $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ HPO ₄ 、pH7.0 | $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ HPO ₄ 、pH5.0 | 1.9 | 98 |
| $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ HPO ₄ 、pH7.0 | $H_2N-CH_2-CH_2-NH_2$ HPO ₄ 、pH5.0 | 1.9 | 98 |
| 酢酸-酢酸ナトリウム、pH7.0 | 酢酸-酢酸ナトリウム、pH5.0 | 1.6 | 97 |

(注)

1) マッキルベイン緩衝液は、0.1 モル酢酸と0.2 モル第一リン酸ナトリウムとを混合し、

所定のpHに調整した。他の緩衝液の濃度は全て100ミリモルである。

2) NDは測定しなかったことを示す。

【0031】(試験例3) この試験は、この発明の方法において脱着に使用する緩衝液について調べるために行った。参考例と同一の方法により製造した出発物質 (ラッ50

※ラクトフェリンを含有するペプチド混合物) 2.0 gを5% (W/V) の濃度で水に溶解した。これとは別にブチル・トヨパール (商標、東ソー社製) 650Mをマッキル

ベイン緩衝液(0.1モル酢酸と0.2モル第二リン酸ナトリウムとを177:824の比率で混合、pH7.0)で洗浄し、平衡化した。純粋のラクトフェリン4mgをマツキルベイン緩衝液に溶解し、疎水性担体5.0mlに吸着させ、水で洗浄し、のち表2に示す酸溶液15mlでラクトフェリンを溶出し、ラクトフェリンの回収率を次式により算出して試験した。

【0032】

$$R(\%) = 100 \times (A/2.203 \times V) / 4$$

ここでRは百分率で表したラクトフェリンの回収率、Aは溶出されたラクトフェリン溶液の280nmにおける吸光度、Vは溶出されたラクトフェリン溶液の総容量、2.203は純ラクトフェリン標準溶液(1.00mg/ml)の吸光度、4は最初に疎水性担体に吸着させたラクトフェリンの量、をそれぞれ示す。

【0033】この試験の結果は、表2に示したとおりである。ラクトフェリンは酸濃度1~30ミリモルで溶出され、10ミリモル以上で高い回収率を示したが、最終製品中に含有される酸の量を少なくするためには、10ミリモルの濃度が望ましいことが明らかとなった。またこの発明の方法においては塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、クエン酸が使用し得ることが判明した。なお、脱塩の場合にもほぼ同様の結果が得られた。

【0034】

【表2】

| 酢 溶 液 | 回収率(%) |
|-----------|--------|
| 1mM 塩酸 | 3 |
| 2mM 塩酸 | 12 |
| 5mM 塩酸 | 26 |
| 10mM 塩酸 | 98 |
| 20mM 塩酸 | 99 |
| 30mM 塩酸 | 99 |
| 10mM 硫酸 | 97 |
| 10mM リン酸 | 97 |
| 10mM 酢酸 | 97 |
| 10mM クエン酸 | 84 |

【0035】(試験例4)この試験は、陽イオン担体からのラクトフェリン溶出液の種類およびその濃度を調べるために行った。カルボキシメチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Sを用いたこと、10ミリモル第一リン酸カリウム第二リン酸カリウム緩衝液(pH7.8)で陽イオン担体を洗浄して平衡化したこと、同じ緩衝液に溶解したラクトフェリンを陽イオン担体に吸着させたこと、および表3に示す塩溶液15mlでラクトフェリンを溶出したことを除き、試験例3と同一の方法により試験を行った。

【0036】この試験の結果は表3に示したとおりである。表3から明らかなようにラクトフェリンは1~4モルの塩溶液で溶出されたが、2モル以上の濃度で高い回収率が得られた。試験した酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム、および塩化カリウムのいずれもラクトフェリンの溶出に使用できることが判明した。

【0037】

【表3】

| 11 | |
|----------------|-------|
| 塩 浴 液 | 回収率 % |
| 0.5 モル酢酸アンモニウム | 2 |
| 1.0 モル酢酸アンモニウム | 48 |
| 2.0 モル酢酸アンモニウム | 94 |
| 3.0 モル酢酸アンモニウム | 95 |
| 2.0 モル塩化アンモニウム | 94 |
| 1.0 モル塩化ナトリウム | 4 |
| 2.0 モル塩化ナトリウム | 12 |
| 3.0 モル塩化ナトリウム | 64 |
| 4.0 モル塩化ナトリウム | 72 |
| 3.0 モル塩化カリウム | 66 |

(注) 酢酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムは水に溶解し、塩化ナトリウムおよび塩化

カリウムは10ミリモル第一リン酸カリウム-第二リン酸カリウム緩衝液に溶解し、

全ての溶液のpHを7.8に調整した。

【0038】(参考例) 脱脂乳から分離した牛ラクトフェリン(森永乳業社製、純度約90%)2.0kgを5%(W/V)の濃度で蒸留水に溶解し、1規定塩酸を添加してpHを3.0に調整した。結晶ペプシン(ディコ社製)を基質の3%の割合で添加し、37℃で4時間加水分解し、のち80℃に15分間加熱してペプシンを失活させ、1規定水酸化ナトリウムを添加してpHを7.0に調整し、不溶物を濾過して除去し、噴霧乾燥し、ラクトフェリンを約4%含有する粉末状のペプチド混合物約1.9kgを得た。次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0039】

【実施例】

実施例1

参考例と同一の方法により製造した出発物質50gを5%(W/V)の濃度で蒸留水に溶解した。約400mlのカルボキシメチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Sを100ミリモル第一リン酸ナトリウム-第二リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.8)で充分洗浄して平衡化した。攪拌機付き容器内で出発物質の水溶液を陽イオン担体に吸着させ、液を分離し、陽イオン担体をカラム(長さ10cm、直径8cm)に充填し、分離した液を再度カラムに通液し、のち洗浄液の280nmにおける吸光度が0.06以下になるまで20ml/分の流速で上記緩衝液を用いてカラムを充分洗浄した。次いで2モル酢酸アンモニウム*50

*ム(pH7.8)をカラムに通液し、ラクトフェリンを溶出し、約500mlのブチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Mを充填したカラム(長さ10cm、直径8cm)に溶出液を通液し、疎水性担体を5000mlの水で洗浄して緩衝液の塩を除去し、のち100ミリモル塩酸をカラムに通液してラクトフェリンを溶出し、凍結乾燥し、粉末状のラクトフェリン約1.4gを得た。得られたラクトフェリンを試験例1と同一の方法により試験した結果、純度は92%であった。

実施例2

参考例と同一の方法により製造した出発物質256gを5%(W/V)の濃度で蒸留水に溶解した。約1000mlのブチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Mを水で充分洗浄して平衡化した。攪拌機付きタンク内で出発物質を疎水性担体に吸着させ、液を分離し、疎水性担体をカラム(長さ22cm、直径8cm)に充填し、分離した液を再度カラムに通液し、のち洗浄液の280nmにおける吸光度が0.06以下になるまで100ml/分の流速で水を用いてカラムを充分洗浄した。次いで100ミリモル塩酸をカラムに通液し、ラクトフェリンを溶出し、等量のマッカルベイン緩衝液(0.1モル酢酸177:0.2モル第一リン酸ナトリウム824の混合物、pH7.0)と混合し、疎水性担体に吸着させ、2000mlの同じ緩衝液で洗浄し、3000mlのマッカルベイン緩衝液(0.1モル酢酸485:0.2モル第一リン酸ナトリウム515の混合物、pH5.0)でラクトフェリンを溶出した。疎

13

水性担体を10ミリモル塩酸および水で再生し、1規定水酸化ナトリウム溶液で溶出液のpHを7.0に調整し、再生したカラムに溶出液を通過し、10 lの水で洗浄して緩衝液の塩を除去し、のち10ミリモル塩酸をカラムに通過してラクトフェリシンを溶出し、凍結乾燥し、粉末状のラクトフェリシン約3.5gを得た。得られたラクトフェリシンを試験例1と同一の方法により試験した結果、純度は98%であった。

実施例3

参考例と同一の方法により製造した出発物質233gを5% (w/v) の濃度で蒸留水に溶解したこと、約1100mlのブチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Mを用いたこと、および脱塩に限外透析装置(ロミコン社製、モデル1.0-43-PM1、分子量分画1000のホロファイバー・フィルター・カートリッジ装着)を用いたことを除き、実施例2と同一の方法により粉末状のラクトフェリシン約1.6gを得た。得られたラクトフェリシンを試験例1と同一の方法により試験した結果、純度は98%であった。

実施例4

参考例と同一の方法により製造した出発物質600gを5% (w/v) の濃度で蒸留水に溶解した。約3000mlのブチル・トヨパール(商標、東ソー社製)650Mを水で充分洗浄して平衡化した。攪拌機付きタンク内で出発物質を疎水性担体に吸着させ、液を分離し、疎水性担体をカラム(長さ10cm、直径20cm)に充填し、分離した液を再度カラムに通過し、のち洗浄液の280nmにおける吸光度が0.06以下になるまで400ml/分の流速で水を用いてカラムを充分洗浄した。次いで10ミリモ

14

ル塩酸をカラムに通過し、ラクトフェリシンを溶出し、等量のマックスバイン緩衝液(0.1モル酢酸177:0.2モル第一リン酸ナトリウム823の混合物、pH7.0)と混合し、疎水性担体に吸着させ、6 lの同じ緩衝液で洗浄し、9 lのマックスバイン緩衝液(0.1モル酢酸85:0.2モル第一リン酸ナトリウム515の混合物、pH5.0)でラクトフェリシンを溶出した。疎水性担体を10ミリモル塩酸および水で再生し、1規定水酸化ナトリウム溶液で溶出液のpHを7.0に調整し、再生したカラムに溶出液を通過し、30 lの水で洗浄して緩衝液の塩を除去し、のち10ミリモル塩酸をカラムに通過してラクトフェリシンを溶出し、凍結乾燥し、粉末状のラクトフェリシン約10.5gを得た。得られたラクトフェリシンを試験例1と同一の方法により試験した結果、純度は99%であった。

【0040】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって次のような効果が得られる。

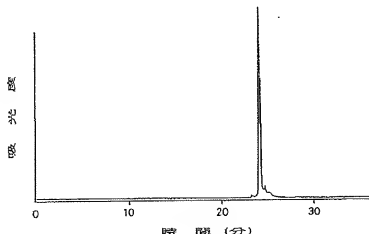
(1) 人および動物に有害な化学薬品(例えば有機溶媒等)を使用しないので、安全に大量の高純度ラクトフェリシンを製造することができる。

(2) 複雑な装置等を使用せずに簡便に高純度のラクトフェリシンを製造することができる。

(3) 所望の製造量に合わせて容易に規模を増減できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の方法により製造したラクトフェリシンの分析例を示す高速液体クロマトグラムである。



【図1】

Family list
14 family members for: JP5238948
Derived from: 10 applications

Back to JP5238948

- 1 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity
Inventor: TOMITA MAHORO; SHIMAMURA SEIICHI; (+6) Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+19)
Publication info: AU649142B B2 - 1994-05-12
- 2 A PROCESS FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE IN HIGH PURITY
Inventor: Applicant:
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+19)
Publication info: AU1839792 A - 1992-12-24
- 3 PROCESS FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE IN HIGH PURITY
Inventor: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI Applicant: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI (JP); (+6)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+17)
Publication info: CA2070882 A1 - 1992-12-22
CA2070882 C - 1999-08-10
- 4 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity.
Inventor: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD (JP)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+21)
Publication info: DE69219015D D1 - 1997-05-22
- 5 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity.
Inventor: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD (JP)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+21)
Publication info: DE69219015T T2 - 1997-07-24
- 6 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity.
Inventor: FUKUWATARI YASUO (JP); BELLAMY WAYNE Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD (JP)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+20)
Publication info: DK519726T T3 - 1997-05-12
- 7 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity.
Inventor: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD (JP)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+18)
Publication info: EP0519726 A2 - 1992-12-23
EP0519726 A3 - 1993-07-28
EP0519726 B1 - 1997-04-16
- 8 A process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity.
Inventor: TOMITA MAHORO; SHIMAMURA SEIICHI; (+6) Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+18)
Publication info: JP3110078B2 B2 - 2000-11-20
JP5238948 A - 1993-09-17
- 9 PRODUCTION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVED FROM LACTOFERRIN
Inventor: MAHORO TOMITA; SEIICHI SHIMAMURA; (+6) Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+24)
Publication info: NZ243120 A - 1994-08-26
- 10 Process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity
Inventor: TOMITA MAHORO (JP); SHIMAMURA SEIICHI Applicant: MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD (JP)
EC: C07K14/79 IPC: A61K38/00; A61P31/04; C07K14 (+18)
Publication info: US5317084 A - 1994-05-31

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

? .li

1/1 - (C) PAJ / JPO

PN - JP5238948 A 19930917

PA - MORINAGA MILK IND CO LTD

I - A61K37/02 ; C07K7/10 ; C12P21/06

TI - LARGE-SCALE PRODUCTION OF LACTOFERRICIN

AB - PURPOSE: To provide a production process of a lactoferricin of at least 90% purity which has antimicrobial activity nearly comparable to those of broad spectra antibiotics, in the scale of at least gram unit.

- CONSTITUTION: A peptide mixture of enzymic hydrolyzate of bovine lactoferrin containing an antimicrobial peptide, lactoferricin, is adsorbed on the chromatograph carrier having butyl groups or a carrier for cation-exchange chromatography. The carrier is washed and the antimicrobial peptide is eluted out and the eluate is desalted to give a large amount of lactoferricin of high purity. Since no chemical hazardous to human and animals such as organic solvents is used, a large amount of lactoferricin of high purity can be produced safely. Further, lactoferricin of high purity can be

Continue: Y / N

? y

produced by no use of complicated production devices and the production scale can easily be adjusted to any desired level.